

PCT/JP 03/13503

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

JP03/13503
22.10.03

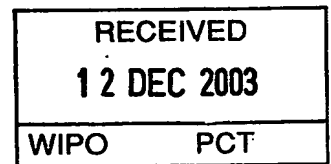
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2003年 2月18日

出 願 番 号
Application Number: 特願2003-040250
[ST. 10/C]: [JP 2003-040250]

出 願 人
Applicant(s): 千寿製薬株式会社

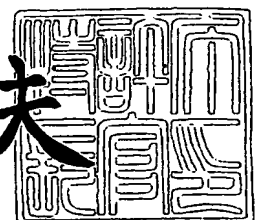


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年11月28日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2003-3098471

【書類名】 特許願

【整理番号】 601-03

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K 31/31
A61P 27/02

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市垂水区小東山本町 2 丁目 2 1 番 1 - 9 0 2 号

【氏名】 高山 美子

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市西区南別府 4 丁目 3 6 6 番地の 1 - 1 0 6 号

【氏名】 中村 義邦

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市須磨区白川字不計 1 番地の 6 6 0 3 号

【氏名】 井上 淳

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県西宮市満池谷町 4 番 1 3 - 1 0 2 号

【氏名】 東 光佳

【特許出願人】

【識別番号】 000199175

【氏名又は名称】 千寿製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100118360

【弁理士】

【氏名又は名称】 松田 玲子

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2002-318881

【出願日】 平成14年10月31日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 004167

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0104918

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 角膜障害治療剤

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ソマトスタチン受容体作働薬を含有する角膜神経軸索伸展促進剤。

【請求項2】 ソマトスタチン受容体作働薬を含有する角膜知覚回復剤。

【請求項3】 ソマトスタチン受容体作働薬を含有するドライアイ治療剤。

【請求項4】 ソマトスタチン受容体作働薬を含有する角膜上皮欠損治療剤。

。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明はソマトスタチン受容体作働薬を含有する角膜神経軸索伸展促進剤、および角膜神経軸索伸展による角膜知覚の回復、改善、並びにドライアイ及び角膜欠損の治療剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

レーザー屈折矯正角膜切除術（PRK）、レーザー角膜切削形成術（レーシック；LASIK）、角膜移植などの角膜手術後には、角膜神経が切断されるため、通常約3週間から約1年間角膜知覚機能の低下症状が起きるといわれている。そしてこの角膜知覚機能の低下から角膜手術後の患者では瞬目回数が減少しドライアイ症状が認められることが問題となっている。

また、ドライアイ患者では、涙液機能の低下から角膜知覚の低下をもたらし、さらにこの角膜知覚の低下がさらなる涙液機能の低下と循環し、角膜表面の症状がさらに悪化することが問題となっている。

しかし、現在角膜手術後の角膜知覚の回復は自然回復に委ねられ、またドライアイの治療においても角膜知覚を回復させるための積極的治療は施されていないのが現状である。

【0003】

一方、ソマトスタチン(somatostatin)は、成長ホルモン抑制因子 (somatotropin release inhibiting factor ; SRIF) として、1973年に視床下部から単離されたペプチドで、現在までに、5個のサブタイプのソマトスタチン受容体が見出されており、それぞれSSTR1、SSTR2、SSTR3、SSTR4およびSSTR5と命名されている。ソマトスタチンは成長ホルモン抑制因子として神経組織に広く分布し、眼組織においても虹彩、毛様体、網膜にソマトスタチン受容体が存在することが確認されている(例えば、非特許文献1参照。)。

【0004】

また、ソマトスタチンは生体内において、内分泌系、外分泌系、神経系などにおいて多彩な機能を有し、例えば、神経伝達や神経細胞成長調節などに関与すること、また、PC12細胞において神経軸索伸展を促進させる作用があると報告されている(例えば、非特許文献2参照。)。

ソマトスタチンが関与する眼疾患としては、緑内障、角膜実質の炎症、虹彩炎、網膜炎、白内障、結膜炎などが知られている(例えば、特許文献1参照。)。

【0005】

ソマトスタチンそのもの、またはその類縁体を医薬品として開発する試みもなされており、例えば、ソマトスタチン受容体作働薬として知られているオクトレオチド(octreotide)は消化管ホルモン産生腫瘍および末端肥大症・下垂体性巨人症の治療薬として市販されている。その他、例えば;

ランレオタイド(lanreotide) (例えば、特許文献2参照。)、

AN-238 (例えば、特許文献3参照。)、

PTR-3173 (例えば、特許文献4参照。)、

SSTR2、SSTR3に親和性を有するアミン誘導体(例えば、特許文献5参照。)、

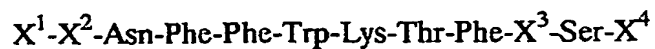
ソマトスタチン受容体機能調節作用を有し、糖尿病、肥満糖尿病合併症などの予防または治療に有用な芳香族アミン誘導体(例えば、特許文献6参照。)、

ソマトスタチン受容体作働作用を有し、糖尿病などの予防または治療に有用な縮合環化合物(例えば、特許文献7参照。)、

例えば、式

【0006】

【化1】



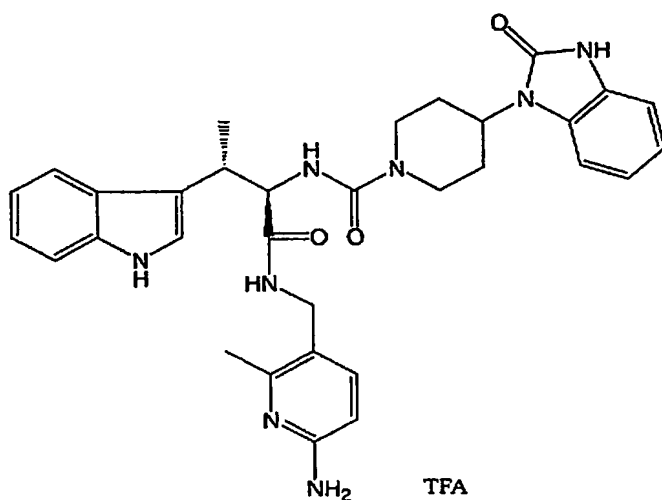
【0007】

[X¹はAsp-Arg-Met-Pro-Cys, Arg-Met-Pro-Cys, Met-Pro-Cys, Pro-CysまたはCysを、X²はArgまたはLysを、X³はSerまたはThrを、X⁴がCys-LysまたはCysを示す。]で示されるソマトスタチン様活性を有するペプチド（例えば、特許文献8参照。）

例えば、式

【0008】

【化2】



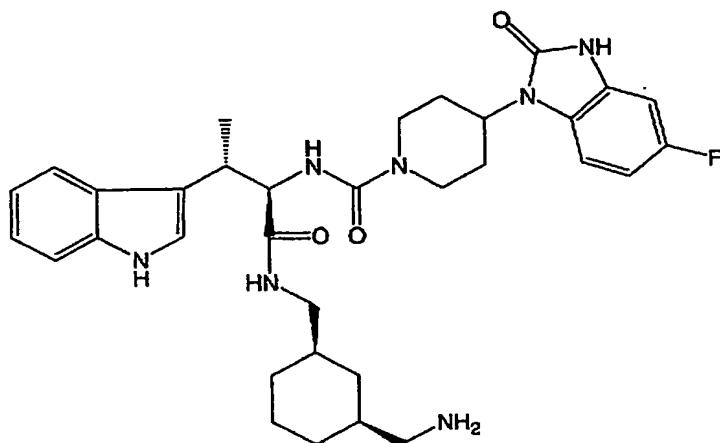
【0009】

などで表されるソマトスタチン作働薬（例えば、特許文献9参照。）

例えば、式

【0010】

【化3】



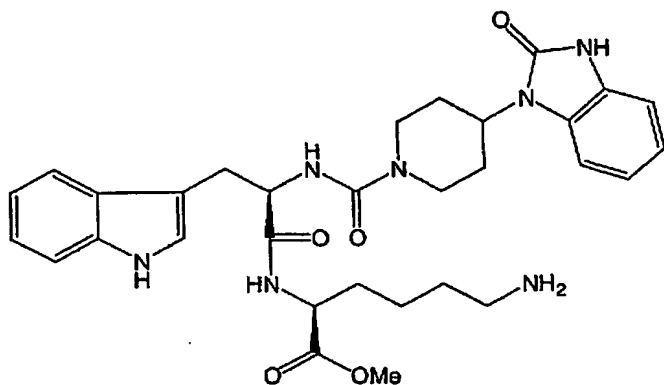
【0 0 1 1】

などで表されるソマトスタチン作働薬（例えば、特許文献10参照。）、

例えば、式

【 0 0 1 2 】

【化4】



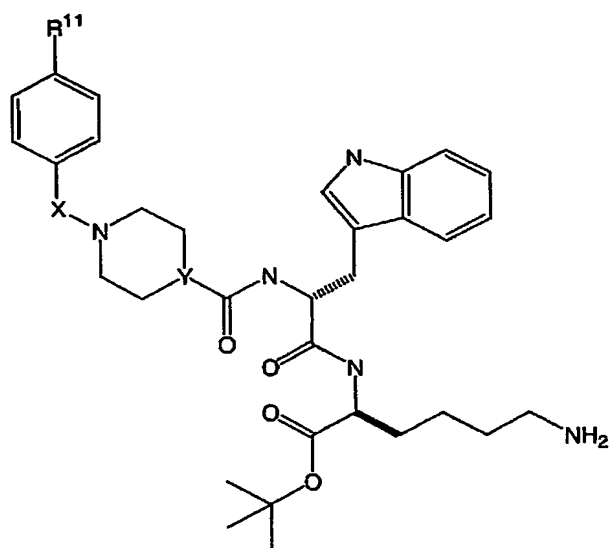
【0 0 1 3】

などで表されるソマトスタチン作働薬（例えば、特許文献 11 参照。）、

式

【0 0 1 4】

【化5】



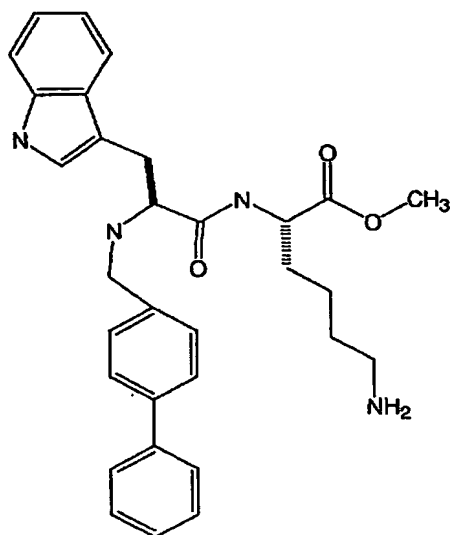
【0015】

〔式中、R¹¹は、ハロゲン原子、シアノ基、カルボキシ基、(C₁-C₆) アルキル基、及び (C₁-C₆) アルコキシ基から選択した基であり；Xは、-CH₂-基、-SO₂-基、-CO-基、又は直接結合であり；そしてYは、CH基又は窒素原子である〕などで表されるソマトスタチンアゴニスト（例えば、特許文献1 2 参照。）

例えば、式

【0016】

【化6】



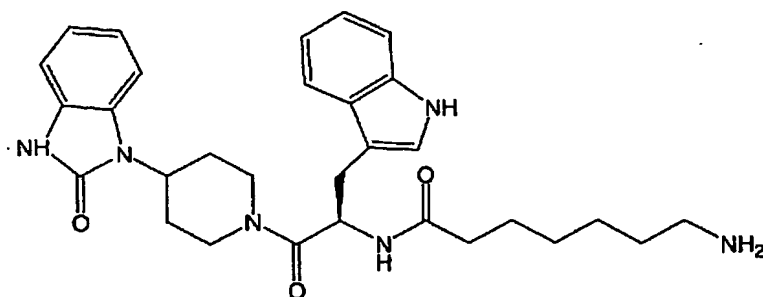
【0017】

などで表されるソマトスタチンアゴニスト（例えば、特許文献13参照。）、
 例えば、5-グアニジノ-2（（2-（トルエン-4-スルフォニル）-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボニル）-アミノ）-ペンタン酸メチルエステルなどのSSTR2に作用するソマトスタチンアゴニスト（例えば、特許文献14参照。）、

例えば、式

【0018】

【化7】

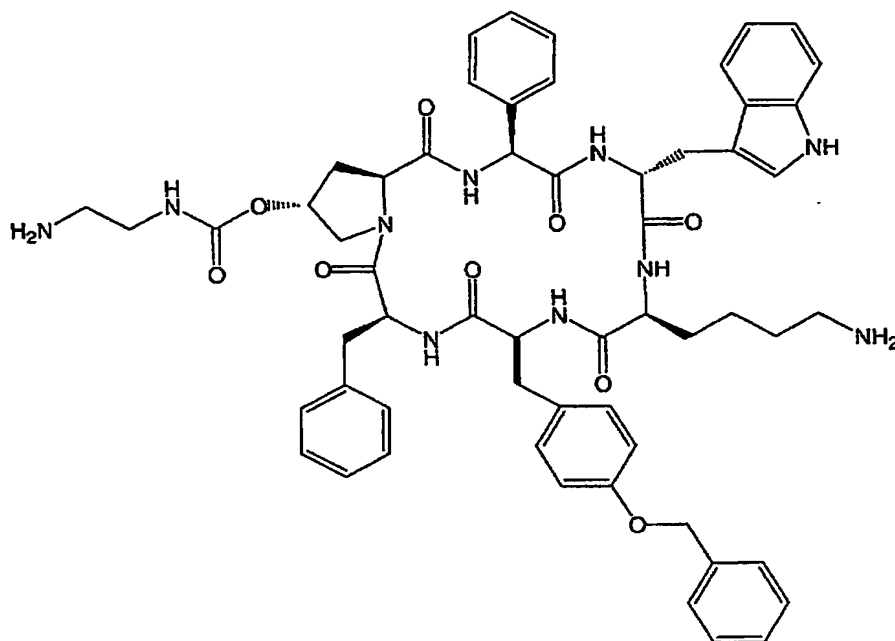


【0019】

などで表されるソマトスタチンアゴニスト（例えば、特許文献15参照。）、
式

【0020】

【化8】

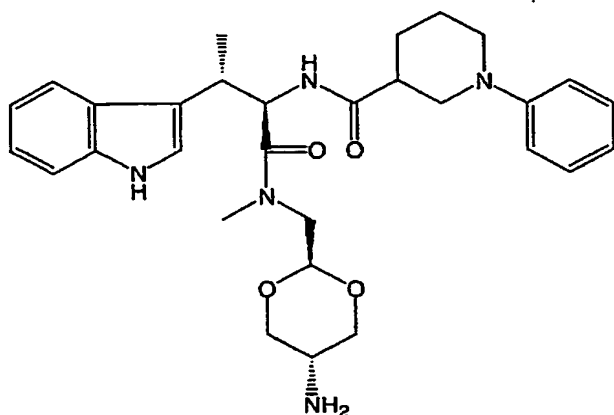


【0021】

で示されるソマトスタチンアナログ（例えば、特許文献16参照。）、
ソマトスタチンの1以上のサブタイプの受容体からアゴニスト効果を引き起こす
イミダゾリル誘導体（例えば、特許文献17参照。）、
ソマトスタチン受容体と親和性を持つヒダントイン誘導体（例えば、特許文献1
8参照。）、
ソマトスタチン受容体のリガンドとして有用な4-アミノピペリジン誘導体（例
えば、特許文献19参照。）、
例えば、式

【0022】

【化9】

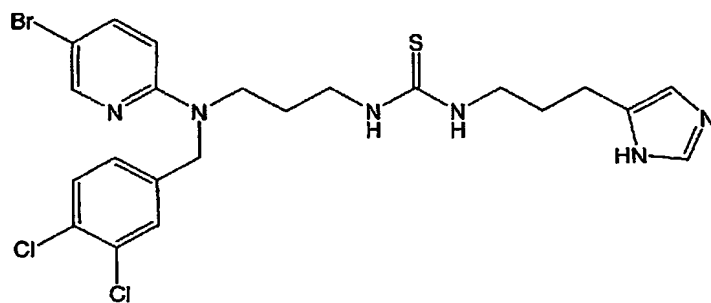


【0023】

などで表されるソマトスタチンアゴニスト（例えば、特許文献20参照。）、
 例えば、Phe-シクロ(Cys-D-Trp-Lys-Cys)-Thr-NH₂で示されるSSTR1アゴニスト（例えば、特許文献21参照。）
 選択的SSTR4結合作用を有し、緑内障治療作用が期待されるとして、式

【0024】

【化10】

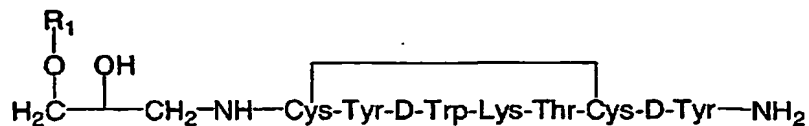


【0025】

などで表される化合物（例えば、特許文献22参照。）、
 式

【0026】

【化11】

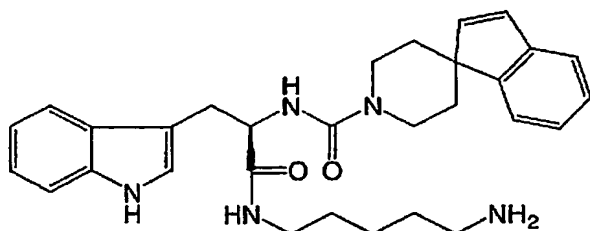


【0027】

〔式中、R₁はC₁－C₄アルキル、アダマンチルなどを示す〕で示されるソマトスタチンアナログ（例えば、特許文献23参照。）
 例えば、式

【0028】

【化12】

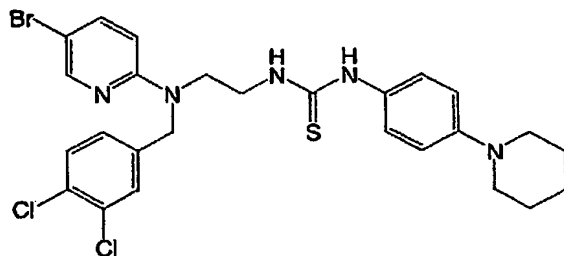


【0029】

などで示されるソマトスタチンアゴニスト（例えば、特許文献24参照。）
 例えば、式

【0030】

【化13】

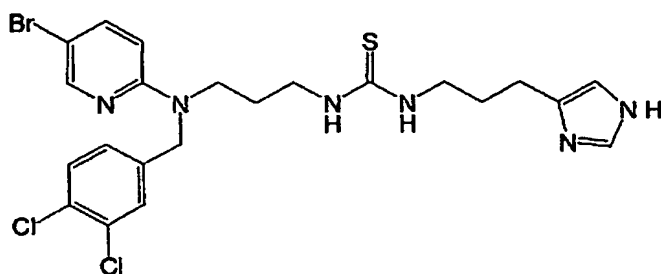


【0031】

などで示されるソマトスタチンアゴニスト（例えば、特許文献 25 参照。）、
例えば、式

【0032】

【化 14】

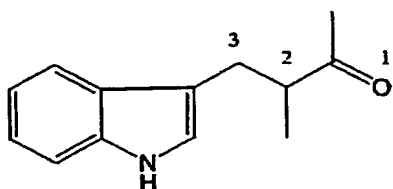


【0033】

などで示されるソマトスタチンの作働因子（例えば、特許文献 26 参照。）、
例えば、シクロ [Tyr-D-Trp-Lys-Val-Phe (4-(3-メトキシフェニル)イミダゾール)-Gly] などで示されるサイクリックソマトスタチン類似体（例えば、特許文献 27 参照。）、
不安、鬱などの処置に有用な SST1 選択的アゴニストであるエルゴリン誘導体（例えば、特許文献 28 参照。）、
ソマトスタチン受容体機能調節剤としてのビフェニル化合物（例えば、特許文献 29 参照。）、
ソマトスタチン受容体に結合して、Na チャンネルを遮断する β -カルボリン誘導体（例えば、特許文献 30 参照。）、
バプレオチド (vaptotide)（例えば、非特許文献 4）、
ソマトスタチン受容体結合阻害作用を有する化合物で、基：

【0034】

【化15】



【0035】

の2位に窒素原子が置換していることに特徴がある特異な化学構造を有するアミン誘導体（例えば、特許文献31参照。）、およびソマトスタチンレセプターに対して親和性および選択性を有するピリドチエノジアゼピン（例えば、特許文献32参照）などが知られている。

【0036】

その一方、角膜においては、角膜にソマトスタチン受容体が存在することは未だ報告されていない。また、角膜の神経に関して、三叉神経節で分岐する第一枝（ophthalmic branch）由来の神経のほとんどが角膜に分布し、角膜の術後知覚回復、角膜上皮の修復などに深く関わっていることが報告されている（例えば、非特許文献3参照。）。

しかし、三叉神経（角膜神経）にソマトスタチン受容体が存在することや、三叉神経（角膜神経）の神経軸索伸展をソマトスタチンが促進させるという報告は認められない。

【0037】

【特許文献1】

特表2002-515912号公報

【特許文献2】

特開平2-289599号公報

【特許文献3】

特表2000-502055号公報

【特許文献4】

特表 2002-518339 号公報

【特許文献 5】

特開 2000-226373 号公報

【特許文献 6】

特開 2000-191615 号公報

【特許文献 7】

特開平 11-209356 号公報

【特許文献 8】

特開平 10-174587 号公報

【特許文献 9】

特表 2001-518895 号公報

【特許文献 10】

特表 2001-519811 号公報

【特許文献 11】

特表 2001-519812 号公報

【特許文献 12】

特開 2001-114761 号公報

【特許文献 13】

特開 2002-3498 号公報

【特許文献 14】

米国特許出願公開第 2002/91125 号明細書

【特許文献 15】

米国特許出願公開第 2002/91090 号明細書

【特許文献 16】

国際公開第 2002/10192 号パンフレット

【特許文献 17】

国際公開第 1999/64401 号パンフレット

【特許文献 18】

国際公開第 2001/85718 号パンフレット

【特許文献 19】

国際公開第 2001/44191 号パンフレット

【特許文献 20】

米国特許第 6387932 号明細書

【特許文献 21】

国際公開第 2000/75186 号パンフレット

【特許文献 22】

米国特許第 6127343 号明細書

【特許文献 23】

国際公開第 2000/10589 号パンフレット

【特許文献 24】

国際公開第 1999/22735 号パンフレット

【特許文献 25】

特表 2001-502712 号公報

【特許文献 26】

特表 2001-525793 号公報

【特許文献 27】

特表 2002-518409 号公報

【特許文献 28】

特表 2001-527580 号公報

【特許文献 29】

特開 2002-80439 号公報

【特許文献 30】

特表 2002-517500 号公報

【特許文献 31】

特開 2002-348287 号公報

【特許文献 32】

特表 2002-541260 号公報

【0038】

【非特許文献 1】

モリ ミキロウ (Mori, Mikiro)、他 2 名、ニューロサイエンス レターズ (Neuroscience Letters)、1997 年、223 巻、3 号、p. 185-188

【非特許文献 2】

フェリーロ エム. ディー. (Ferriero M. D.)、他 2 名、ディベロップメンタル ブレイン リサーチ (Developmental Brain Research)、1994 年、80 巻、p. 13-18

【非特許文献 3】

ケーピン、シュ (Ke-Ping. Xu)、他 2 名、コルネア (Cornea)、1996 年、15 巻、p. 235-239

【非特許文献 4】

シャロン ガザール (Sharon Gazal)、他 7 名、ジャーナル オブ メディシナル ケミストリー (Journal of Medicinal Chemistry)、2002 年、45 巻、p. 1665-1671

【0039】

【発明が解決しようとする課題】

レーザー屈折矯正角膜切除術 (PRK)、レーザー角膜切削形成術 (レーシック; LASIK)、角膜移植などの角膜手術後などの角膜知覚機能低下や、ドライアイ患者における角膜知覚低下が回復し、さらにこの角膜知覚の低下などによる角膜上皮の障害を治療する医薬を提供することである。

【0040】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、角膜の術後の角膜知覚回復やドライアイの症状を改善する新しいタイプの医薬を提供することを目的に検討を行ったところ、ソマトスタチンが三叉神経 (以後、角膜神経ということもある。) の軸索伸展促進効果があること、また三叉神経にソマトスタチン受容体が存在することを初めて見出し、これらの知見に基づいてさらに研究をすすめ、ソマトスタチン受容体作働薬を角膜知覚回復などの医薬として利用する本発明を完成した。

【0041】

すなわち、本発明は、

- (1) ソマトスタチン受容体作働薬を含有する角膜神経軸索伸展促進剤、
- (2) ソマトスタチン受容体作働薬を含有する角膜知覚回復剤、
- (3) ソマトスタチン受容体作働薬を含有するドライアイ治療剤、および
- (4) ソマトスタチン受容体作働薬を含有する角膜上皮欠損治療剤に関するものである。さらに本発明は、上記医薬を製造する方法、角膜知覚を回復するための方法ならびに角膜神経軸索伸展促進、角膜知覚回復や、ドライアイおよび角膜上皮欠損治療のための組成物を提供するものである。

ここで、ソマトスタチン受容体作働薬とは、ソマトスタチンそのものの他、ソマトスタチン受容体に作用し、ソマトスタチンと同様の作用を示すものをいい、ソマトスタチンアゴニスト、ソマトスタチン類似体、ソマトスタチンアナログなどといわれているものを包含する。

【0042】

ソマトスタチン受容体作働薬としては、ソマトスタチンそのものの他、ソマトスタチン受容体に作用しソマトスタチンと同様の作用を示すものであれば、いずれの化合物であっても有利に使用できる。そのような化合物としては、例えば、ソマトスタチン受容体作働薬として知られているオクトレオチド(octreotide)、特開平2-289599号公報(前記特許文献2)に記載のランレオタイド(lanreotide)、バプレオチド(vapreotide)などのオクタペプチド、特表2000-502055号公報(前記特許文献3)に記載の例えばAN-238などのソマトスタチン類似環状ペプチド、特表2002-518339号公報(前記特許文献4)に記載の例えばPTR-3173などの主鎖環化ソマトスタチン類似体、特開2000-226373号公報(前記特許文献5)や特開2002-348287号公報(前記特許文献31)に開示のアミン誘導体、特表2000-191615号公報(前記特許文献6)に記載の芳香族アミン誘導体、特開平11-209356号公報(前記特許文献7)に記載の縮合環化合物、特開平10-174587号公報(前記特許文献8)に記載のペプチド類、特表2001-518895号公報(前記特許文献9)、特表2001-519811号公報(前

記特許文献10) および特表2001-519812号公報(前記特許文献11) に記載のソマトスタチン作働薬、特開2001-114761号公報(前記特許文献12)、特開2002-3498号公報(前記特許文献13)、米国特許出願公開第2002/91125号明細書(前記特許文献14)、米国特許出願公開第2002/91090号明細書(前記特許文献15)、米国特許第6387932号明細書(前記特許文献20)、国際公開第99/22735号パンフレット(前記特許文献24)、特表2001-502712号公報(前記特許文献25) に記載のソマトスタチンアゴニスト、国際公開第02/10192号パンフレット(前記特許文献16) および国際公開第00/10589号パンフレット(前記特許文献23) に記載のソマトスタチンアナログ、国際公開第99/64401号パンフレット(前記特許文献17) に記載のイミダゾリル誘導体、国際公開第01/85718号パンフレット(前記特許文献18) に記載のヒダントイン誘導体、国際公開第01/44191号パンフレット(前記特許文献19) に記載の4-アミノピペリジン誘導体、国際公開第00/75186号パンフレット(前記特許文献21) に記載のSSTR1アゴニスト、米国特許第6127343号明細書(前記特許文献22) に記載の選択的SSTR4結合作用を有し、緑内障治療作用を示す化合物、特表2001-525793号公報(前記特許文献26) に記載のソマトスタチンの作働因子、特表2002-518409号公報(前記特許文献27) に記載のサイクリックソマトスタチン類似体、特表2001-527580号公報(前記特許文献28) に記載のエルゴリン誘導体、特開2002-80439号公報(前記特許文献29) に記載のビフェニル化合物、特表2002-517500号公報(前記特許文献30) に記載の β -カルボリル誘導体、および特表2002-541260号公報(前記特許文献32) に記載のピリドチエノジアゼピンなどが挙げられる。

【0043】

本発明の医薬は、哺乳動物(例えばヒト、ラット、マウス、ウサギ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコなど)の角膜神経が障害、切断または欠損した、例えばPRKやLASIK後の低下した角膜知覚回復のための治療薬として、あるいは角膜知覚の低下したドライアイの治療薬として有用である。

【0044】

本発明の医薬は全身的または局所的に投与される。全身的には経口投与の他、静脈内注射、皮下注射、筋肉内注射など非経口的にも投与される。局所的には、眼に投与される。

【0045】

本発明の医薬の製剤形態としては、粉末、顆粒、錠剤、カプセル剤、坐剤などの固形剤、およびシロップ剤、注射剤、点眼剤などの液剤などが挙げられる。顆粒および錠剤として製造する場合には、例えば賦形剤（乳糖、白糖、ブドウ糖、デンプン、結晶セルロースなど）、滑沢剤（ステアリン酸マグネシウム、タルク、ステアリン酸、ステアリン酸カルシウムなど）、崩壊剤（デンプン、カルメロースナトリウム、炭酸カルシウムなど）、結合剤（デンプン糊液、ヒドロキシプロピルセルロース液、カルメロース液、アラビアゴム液、ゼラチン液、アルギン酸ナトリウム液など）などを用いることにより任意の剤形を製造することができる。また、顆粒剤および錠剤には、適当なコーティング剤（ゼラチン、白糖、アラビアゴム、カルナバロウなど）、腸溶性コーティング剤（例えば酢酸フタル酸セルロース、メタアクリル酸コポリマー、ヒドロキシプロピルセルロースフタレート、カルボキシメチルエチルセルロースなど）などで剤皮を施してもよい。

【0046】

カプセル剤として製造する場合には、適当な賦形剤、例えば流動性と滑沢性を向上させるためのステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、タルク、軽質無水ケイ酸など、また加圧流動性のための結晶セルロースや乳糖などの他、上記崩壊剤などを適宜添加したものを均等に混和または粒状もしくは粒状としたものに適当なコーティング剤で剤皮を施したものを充填するか、適当なカプセル基剤（ゼラチンなど）にグリセリンまたはソルビトールなどを加えて塑性を増したカプセル基剤で被包成形することもできる。これらカプセル剤には必要に応じて、着色剤、保存剤〔二酸化イオウ、パラベン類（パラオキシ安息香酸メチル、エチル、プロピルエステル）〕などを加えることができる。カプセル剤は通常のカプセルの他、腸溶性コーティングカプセル、胃内抵抗性カプセル、放出制御カプセルとすることもできる。腸溶性カプセルとする場合、腸溶性コーティング

剤でコーティングした化合物または化合物に上記の適当な賦形剤を添加したものを通常のカプセルに充填または、カプセル自身を腸溶性コーティング剤でコーティング、もしくは腸溶性高分子を基剤として成形することができる。

【0047】

坐剤として製造する場合には坐剤基剤（例えばカカオ脂、マクロゴールなど）を適宜選択して使用することができる。

【0048】

シロップ剤として製造する場合、例えば安定化剤（エデト酸ナトリウムなど）、懸濁化剤（アラビアゴム、カルメロースなど）、矯味剤（単シロップ、ブドウ糖など）、芳香剤などを適宜選択して使用することができる。

【0049】

本発明の医薬を注射剤または点眼剤として製造する場合、医薬上許容される添加物、例えば等張化剤（塩化ナトリウム、塩化カリウム、グリセリン、マンニトール、ソルビトール、ホウ酸、ホウ砂、ブドウ糖、プロピレングリコールなど）、緩衝剤（リン酸緩衝液、酢酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、炭酸緩衝液、クエン酸緩衝液、トリス緩衝液、グルタミン酸緩衝液、イプシロンアミノカプロン酸緩衝液など）、保存剤（パラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、ベンジルアルコール、塩化ベンザルコニウム、デヒドロ酢酸ナトリウム、エデト酸ナトリウム、ホウ酸、ホウ砂など）、増粘剤（ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコールなど）、安定化剤（亜硫酸水素ナトリウム、チオ硫酸ナトリウム、エデト酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、アスコルビン酸、ジブチルヒドロキシトルエンなど）、pH調整剤（塩酸、水酸化ナトリウム、リン酸、酢酸など）などを適宜添加した溶液に溶解または分散することによって製造することができる。

【0050】

上記シロップ剤、注射剤および点眼剤における添加剤の添加量は、添加する添加剤の種類、用途などによって異なるが、添加剤の目的を達成し得る濃度を添加すればよく、等張化剤は、通常、浸透圧が約229～約343mOsmとなるよう、約0.5～約5.0w/v%を添加する。また、緩衝剤は約0.01～約2

． 0 w／v %程度、増粘剤は約 0． 01 ～約 1． 0 w／v %程度、安定化剤は約 0． 001 ～約 1． 0 w／v %程度になるように添加する。pH調整剤は、適宜添加し、通常 pH約 3 ～約 9、好ましくは約 4 ～約 8 になるように添加する。

特に点眼剤として使用する場合、ソマトスタチン受容体作働薬の濃度は、通常下限は約 0． 0005 w／v %、約 0． 001 w／v %、約 0． 005 w／v % であり、上限は約 1． 0 w／v %、約 0． 5 w／v %、約 0． 1 w／v %、約 0． 05 w／v %、約 0． 01 w／v % に調製される。

【0051】

ソマトスタチン受容体作働薬の投与量は、使用する化合物、対象となる疾患、症状、投与対象、投与方法などにより異なるが、例えばPRK手術後の角膜知覚回復剤として成人の眼に局所的に使用する場合には、例えばソマトスタチン約 0． 01 w／v %含有する点眼液を、1回約 20 ～約 50 μ L、1日数回点眼するのがよい。

【0052】

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA : デオキシリボ核酸

cDNA : 相補的デオキシリボ核酸

DNAse : デオキシリボヌクレアーゼ

A : アデニン

T : チミン

G : グアニン

C : シトシン

RNA : リボ核酸

mRNA : メッセンジャーRNA

Gly : グリシン

A l a : アラニン
V a l : バリン
S e r : セリン
T h r : スレオニン
C y s : システイン
M e t : メチオニン
A s p : アスパラギン酸
L y s : リジン
A r g : アルギニン
P h e : フェニルアラニン
T y r : チロシン
T r p : トリプトファン
P r o : プロリン
A s n : アスパラギン
M e : メチル基

【0053】

【発明の実施の形態】

本発明を以下の試験例及び実施例に従いさらに詳細に説明するが、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。

【0054】

【実施例】

試験例 1. ウサギ三叉神経におけるソマトスタチン受容体の発現

1) 使用動物

福岡養兔組合より購入した日本白色種ウサギ（生後 2 ～ 3 日目）を使用した。

【0055】

2) 試験方法

体重 2.0 kg の日本白色種ウサギにセラクタール(xylazine)：ケタール(ケタミン) = 0.5 : 1 の混合液を筋肉内注射 (0.9 mL / kg) し、全身麻酔を実施した。生理食塩水で心臓灌流後、網膜と三叉神経節をそれぞれ採取した。

TRIzol Reagent (GIBCO BRL社製) を用いたA G P C法により、組織からRNAを抽出し、DNase処理によりゲノムDNAを除去した後、SuperScript II (GIBCO BRL社製)を用いて逆転写反応を行なった。cDNAを、Platinum Taq DNA polymerase (GIBCO BRL社)を用いて表1に記す反応条件で増幅させた。なお、プライマーは表1記載のウサギのソマトスタチン受容体SSTR2遺伝子特異的プライマー(配列番号: 1)とSSTR4遺伝子特異的プライマー(配列番号: 2)を使用した。

【0056】

【表1】

| 動物 | 遺伝子 | プライマー (5'... 3') | PCR反応条件 |
|-----|-------|---|--|
| ウサギ | SSTR2 | TGG CCG TCT TCA TTT TCT GCT CGC CGC TCA CTT TGA CCA AG (配列番号: 1) | 1.5 mM MgCl ₂ , pH 8.4 95℃ (30 秒), 58℃ (1 分), 72℃ (1 分) 35 サイクル |
| | SSTR4 | GTG GGC AAG ATG CGC GCT GTG AAT GGG GTT GGC GCA GCT GTT (配列番号: 2) | 1.5 mM MgCl ₂ , pH 10 95℃ (30 秒), 58℃ (1 分), 72℃ (1 分) 35 サイクル |

【0057】

3) 試験結果

ウサギ網膜と三叉神経節におけるSSTR2およびSSTR4サブタイプをRT-PCR法により解析した結果、SSTR2およびSSTR4ともに発現が認められた。(図1)。

【0058】

試験例2. ウサギ三叉神経節細胞における神経軸索伸展促進作用 (In vitro実験)

1) 使用動物

福岡養兔組合より購入した日本白色種ウサギ(生後2~3日目)を使用した。

。

【0059】

2) 被験物質

試験には、ソマトスタチン(CALBIOCHEM社製, Lot B33795), 神経成長因子(Nerve Growth Factor ; NGF-7S, Sigma社製)を使用した。試験物質はリン

酸緩衝液 (PBS) に $100\ \mu\text{M}$ ソマトスタチン、 $20\ \mu\text{g}/\text{mL}$ NGF-7S になるよう溶解した。調整した試薬は -80°C に保存し、使用前に溶解して使用した。

【0060】

3) 試験方法

三叉神経細胞の単離は Chan らの報告 (Kwan Y. Chan and Richard H. Haschke. Exp. Eye Res. 41: 687-699, 1985) を参考にして行った。すなわち、エーテル麻酔により、生後 2～3 日目のウサギを生理食塩水で心臓灌流後、三叉神経節を切り出し、神経分散液 (住友ベークライト) を用いて、三叉神経節を分散させ、ポリリジン/ラミニンでコートした 24 ウェルプレート (住友ベークライト) に細胞を播種した。細胞数は 1 ウェルあたり約 3000 細胞とし、培養条件は 5% CO_2 、95% 空気環境下、 37°C とした。細胞は 5% 牛血清 (Fetal calf serum; FCS) 添加 ダブルベッコの修正イーグル培地/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12: DMEM/F-12) 培養液中に播種して 24 時間培養後、培養液を FCS 無添加の DMEM/F-12 培養液に交換した。

その後、以下の 5 群:

- (1) 無添加群
- (2) 最終濃度 $1\ \mu\text{M}$ となるようソマトスタチンを添加した群 (以下、 $1\ \mu\text{M}$ ソマトスタチン添加群ということもある。)
- (3) 最終濃度 $10\ \mu\text{M}$ となるようソマトスタチンを添加した群 (以下、 $10\ \mu\text{M}$ ソマトスタチン添加群ということもある。)
- (4) 最終濃度 $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$ となるよう NGF 添加した群 (以下、NGF 添加群ということもある。)
- (5) ソマトスタチンおよび NGF をそれぞれ最終濃度 $1\ \mu\text{M}$ および $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$ となるよう同時に添加した群 (以下、NGF+ソマトスタチン添加群ということもある。)

に分け、さらに 48 時間培養した。

ソマトスタチンおよび NGF による三叉神経細胞の突起形成と軸索伸展に対す

る効果は倒立顕微鏡を用いた観察によって形態的に評価した。

【0061】

4) 試験結果

図2はウサギ三叉神経節細胞を用いた結果を示している。図2中(A)は無添加培養液で培養した三叉神経細胞を、(B)は最終濃度 $1\mu\text{M}$ となるようソマトスタチンを添加して培養した三叉神経細胞を、(C)は最終濃度 $10\mu\text{M}$ となるようソマトスタチンを添加して培養した三叉神経細胞を、(D)は最終濃度 $1\mu\text{g/mL}$ となるようNGFを添加して培養した三叉神経細胞を、(E)はソマトスタチンおよびNGFをそれぞれ最終濃度 $1\mu\text{M}$ および $1\mu\text{g/mL}$ となるよう同時に添加して培養した三叉神経細胞をそれぞれ示す。

無添加培養液で培養した群ではわずかな神経突起の形成が認められた(A)。 $1\mu\text{M}$ ソマトスタチン添加群の神経細胞では(A)に比較し、明らかに軸索伸展が促進され(B)、 $10\mu\text{M}$ ソマトスタチン添加群の神経細胞でも長い軸索伸展を示す細胞が多く観察された(C)。NGF添加群(D)とNGF+ソマトスタチン添加群(E)の神経細胞においても、無添加群(A)に比較して、明らかに神経細胞の神経軸索伸展促進作用が認められた。

【0062】

試験例3. ウサギ角膜神経切断後の角膜知覚機能変化(In vivo 試験)

1) 使用動物

福岡養兔組合より購入した体重 $1.5\text{kg}\sim 2.0\text{kg}$ の雄性日本白色種ウサギを使用した。

【0063】

2) 被験物質

被験物質はソマトスタチン(CALBIOCHEM社製, Lot B33795)、神経成長因子(Nerve growth factor, NGF; NGF-7S, Sigma社製)を使用した。試験物質は、以下に示す基剤に溶解あるいは希釈し、試験に用いた。

基剤処方:

| | |
|------------------|-------|
| 塩化ナトリウム | 0.9 g |
| リン酸2水素ナトリウム・2水和物 | 0.1 g |

水酸化ナトリウム

適量 (pH 7.0)

注射用蒸留水

全量 100 mL

【0064】

3) 試験方法

ウサギにセラクタール(xylazine):ケタール(ケタミン)=0.5:1混合液を筋肉内注射(0.9 mL/kg)し、全身麻酔を実施した。角膜を直径6 mmのトレパンで標識し、その上位180度の角膜を円形切開しながら8.0ナイロン縫合糸で縫合した。縫合の直後から、一ヶ月後まで、基剤(基剤投与群)あるいはソマトスタチン溶液(100 μ M, 0.02%、ソマトスタチン投与群)あるいはNGF溶液(20 μ g/mL, 0.002%、NGF投与群)を50 μ Lずつ、4回/1日、4週間連続点眼投与した。手術後一週間は1日4回の被験物質点眼の際に、同時にタリビット点眼液(Tarivid ophthalmic solution, Santen)を点眼投与し、室温23 \pm 3 $^{\circ}$ C、湿度55 \pm 10%、12時間照明(8:00点灯、20:00消灯)に設定された飼育室内で1ケージあたり1匹収容し、飼育した。角膜の知覚はCochet-Bonnet 角膜知覚計(LUNEAU社製)を用いて、手術3日目と1、2、3、4、6週に測定した。角膜知覚%は、各個体の手術前の知覚を100%とし算出した。

【0065】

4) 試験結果

図3は角膜神経を切断後の角膜知覚の推移を経時的に示している。角膜知覚は角膜切開手術3日後から1週間にかけて、すべての群で急激に低下したが、2週目以降、緩やかな角膜知覚の回復が認められた。3週、4週間後にソマトスタチン投与群において、基剤投与群と比較して有意な角膜知覚回復効果が認められた。

【0066】

試験例4. ウサギ三叉神経細胞の軸索伸展に対するオクトレオチドの効果(In vitro 試験)

1) 使用動物

福崎養兔組合より購入した日本白色種ウサギ(生後2~3日目)を使用した

2) 被験物質

オクトレオチド (Octrotide; SMS 201-995, American Peptide Company, Inc.

)

【0067】

3) 試験方法

細胞培養：三叉神経細胞の単離はChanらの報告 (Kwan Y. Chan and Richard H. Haschke. Exp. Eye Res. 41: 687-699, 1985) を参考にして行った。すなわち、エーテル麻酔下、生理塩水で心臓灌流後、三叉神経節を切り出し、神経分散液 (住友ベークライト) を用いて、三叉神経節を分散させた後、細胞数を計測して、ポリリシンでコートした8ウェルカルチャースライド (BECTON DICKINSON) に細胞を播種した。細胞数は1ウェルあたり約 3×10^3 細胞とし、培養条件は5% CO₂、95% 空気下、37℃とした。細胞培養にはニューロペーサル培養液 (GIBCO) にB27サプリメント (GIBCO; 0.02 mL/mL 培養液) を添加した培養液を用い、細胞播種直後にオクトレオチド (10 μM 最終濃度) を培養液中に添加して24時間培養した。

免疫染色：培養24時間後に、細胞を4%パラホルムアルデヒドで室温で2時間固定し、神経細胞、軸索を特異的に認識する抗ニューロフィラメント200抗体 (NF, Anti-Neurofilament 200, Sigma) を用いて神経細胞および樹状突起を蛍光染色した。染色細胞は蛍光顕微鏡からコンピュータに画像として取り込み、画像解析ソフト (MacSCOP, MITANI CO.) を用いてオクトレオチドによる突起形成と軸索伸展に対する効果を評価した。すなわち、細胞の軸索伸展長を画像解析ソフトを用いて測定し、細胞体の直径の2倍以上長さの軸索を持つ細胞を神経突起形成細胞として全細胞数に対する比率 (%) を計算した。

オクトレオチド添加群の神経突起形成細胞比率と無添加群の神経突起形成細胞比率との比較をt-testにより検定し、危険率5%未満を有意であると判定した。

【0068】

4) 試験結果

図4はオクトレオチドによるウサギ三叉神経の突起、軸索伸展効果を示してい

る。図4Aはオクトレオチド無添加培養液で24時間培養したウサギ三叉神経細胞（コントロール群）を、図4Bはオクトレオチドを最終濃度 $10\mu\text{M}$ 添加した培養液で24時間培養した細胞（オクトレオチド添加群）を示す。コントロール群に比較し、オクトレオチド添加群では神経突起形成細胞が増加することが確認された。

図5は神経突起形成細胞の全細胞数に対する比率（%）を示している。神経突起形成細胞の比率はコントロール群では全細胞の約21%、オクトレオチド添加群では全細胞の約43%であり、オクトレオチド添加による神経突起形成細胞の有意な増加が認められた（図5）。

以上のことから、ソマトスタチンのアナログであるオクトレオチドは三叉神経細胞の軸索伸展を促進することが分った。

【0069】

実施例1 錠剤

| | |
|--------------|-------|
| ソマトスタチン | 50 mg |
| 乳糖 | 80 mg |
| デンプン | 17 mg |
| ステアリン酸マグネシウム | 3 mg |
| 結晶セルロース | 10 mg |

以上の成分を1錠分の材料として、常法により錠剤を成形する。錠剤は必要に応じて通常用いられる腸溶性コーティング剤（例えばフタル酸ヒドロキシプロピルメチルセルロースなど）、糖衣およびフィルム（例えばエチルセルロース）を適用してもよい。

【0070】

実施例2 カプセル剤

| | |
|-------------|-------|
| ソマトスタチン | 75 mg |
| マンニトール | 75 mg |
| デンプン | 17 mg |
| ステアリン酸カルシウム | 3 mg |

以上の成分を1カプセル剤の材料として均一に混合し、常法により顆粒状とし

、硬カプセルに充填する。この充填する前に必要に応じて顆粒は通常用いられる腸溶性コーティング剤（例えばフタル酸ヒドロキシプロピルメチルセルロース）、糖衣またはフィルム（例えばエチルセルロース）を適用してもよい。

【0071】

実施例 3 注射剤

| | | |
|--------------------|-----|--------|
| ソマトスタチン | 750 | mg |
| カルボキシメチルセルロースナトリウム | 500 | mg |
| 注射用水 | 全量 | 100 mL |

以上の成分を常法により無菌的に混和して注射剤を調製する。

【0072】

実施例 4 点眼剤

| | | |
|---------------|-------------|--------|
| ソマトスタチン | 50 | mg |
| ホウ酸 | 700 | mg |
| ホウ砂 | 適量 (pH 7.0) | |
| 塩化ナトリウム | 500 | mg |
| ヒドロキシメチルセルロース | 0.5 | g |
| エデト酸ナトリウム | 0.05 | mg |
| 塩化ベンザルコニウム | 0.005 | mg |
| 滅菌精製水 | 全量 | 100 mL |

滅菌精製水 80 mL を約 80℃ まで加温し、ヒドロキシメチルセルロースを加えて攪拌し、液温を室温まで戻す。この液にソマトスタチン、塩化ナトリウム、ホウ酸、エデト酸ナトリウムおよび塩化ベンザルコニウムを加えて溶解する。ホウ砂を適量加えて pH を 7 に調整する。滅菌精製水を加えて 100 mL までメスアップする。

【0073】

実施例 5 点眼剤

| | | |
|-------------|-----|----|
| 酢酸オクトレオチド | 112 | mg |
| D-マンニトール | 4.5 | g |
| リン酸二水素ナトリウム | 0.1 | g |

水酸化ナトリウム

適量 (pH 7.0)

滅菌精製水

全量 100 mL

滅菌精製水 80 mL に酢酸オクトレオチド、D-マンニトール、リン酸二水素ナトリウムを加えて溶解する。水酸化ナトリウムを適量加えて pH を 7.0 に調整する。滅菌精製水を加えて 100 mL までメスアップする。調製した点眼剤をメンブランフィルターで滅菌した後、デスポーザブル（ユニットドース）容器に充填、密封する。

【0074】

【発明の効果】

ソマトスタチン受容体作働薬は三叉神経細胞軸索伸展促進作用および角膜知覚機能回復作用を有することから、角膜神経の損傷などに伴う角膜知覚機能低下の改善および角膜知覚機能低下に伴うドライアイ症状の改善に有用である。具体的には、ソマトスタチン受容体作働薬を適用することにより、白内障手術後や LASIK 手術後の角膜知覚の低下、神経麻痺性角膜症、角膜潰瘍、糖尿病性角膜症などの角膜神経変性に伴う角膜知覚低下、ドライアイ症状の改善効果が期待できる。

【0075】

【配列表】

[Sequence Listing]

<110> Senju Pharmaceutical Co. Ltd.

<120> Novel Protein and its DNA

<130> A medicine of the corneal disorder

<160> 2

<210> 1

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> TGGCCGTCTT CATTTTCTGC TCGCCGCTCA CTTTGACCAA G 41

<210> 2

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> GTGGGCAAGA TGC GCGCTGT GAATGGGGTT GCGCAGCTG TT 42

【0076】

【図面の簡単な説明】

【図1】 ウサギ三叉神経と網膜でのソマトスタチン受容体の発現を示す図である。

【図2】 ウサギ三叉神経節細胞とその細胞からの軸索伸展を示す図である。

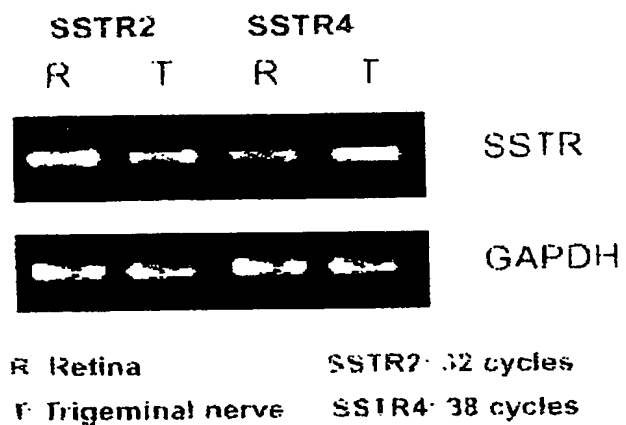
【図3】 ウサギの角膜神経を切断した後の角膜知覚を示す図である。*は基剤投与群に対する有意差 ($p < 0.05$) を示す。

【図4】 ウサギ三叉神経細胞とその細胞からの軸索伸展を示す図である。

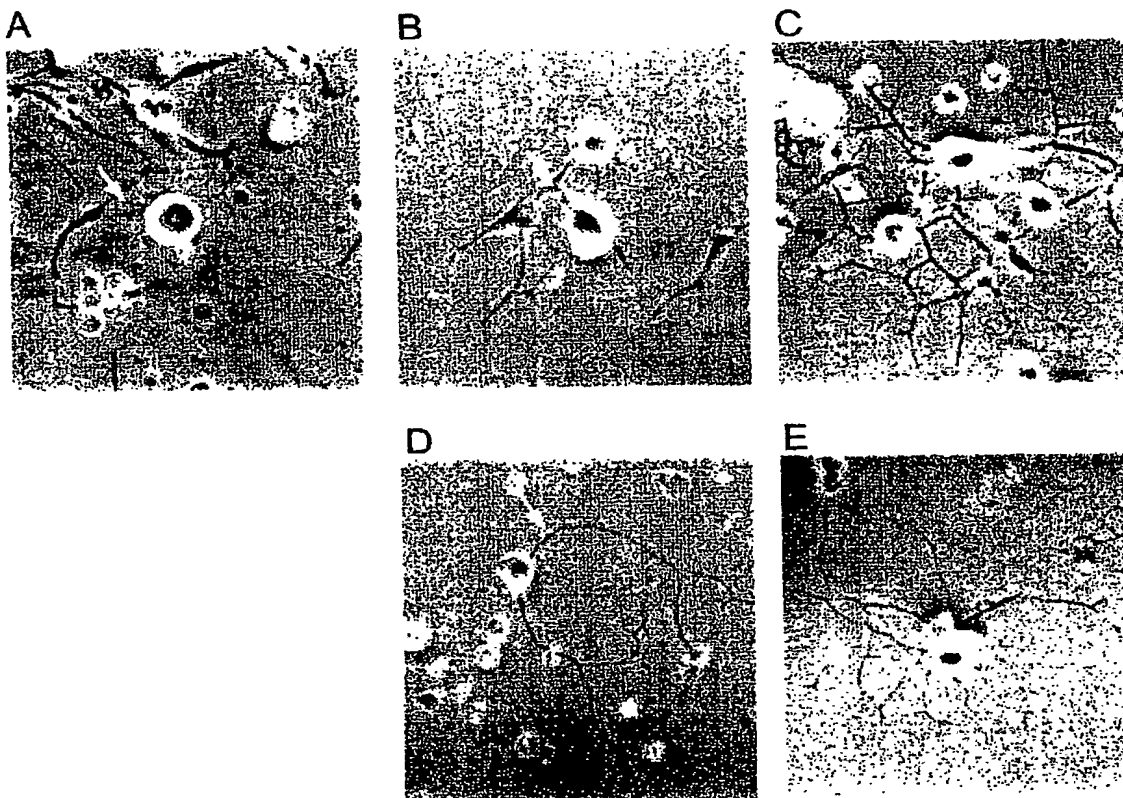
【図5】 図4における全細胞数に対する神経突起形成細胞の比率 (%) 示すグラフである。*はコントロール群に対する有意差 ($p < 0.05$) を示す。

【書類名】 図面

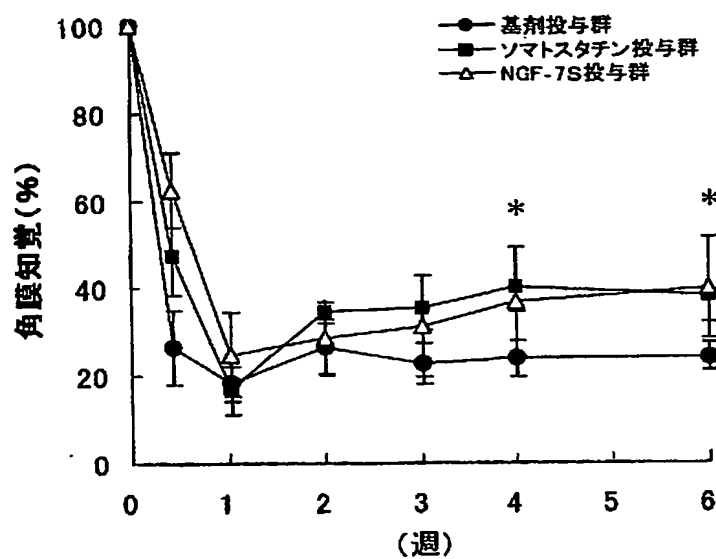
【図 1】



【図 2】

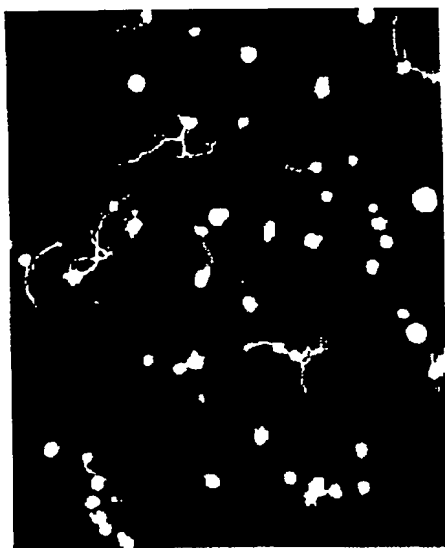


【図 3】



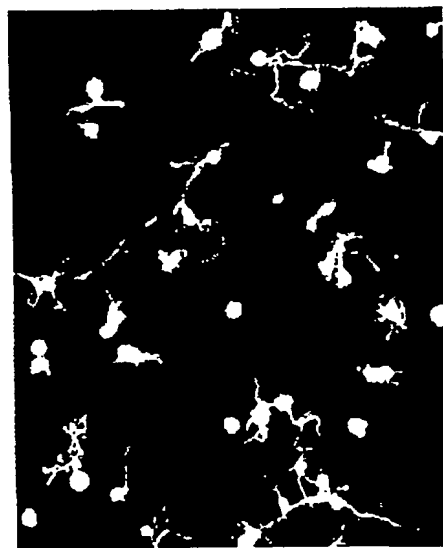
【図 4】

A



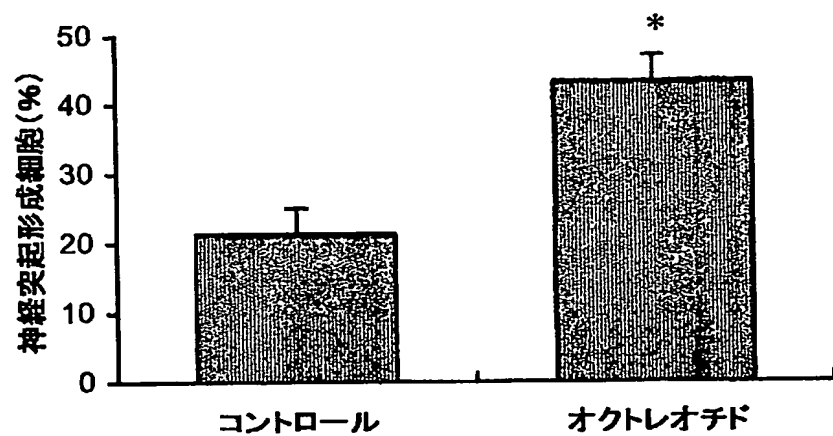
コントロール

B



オクトレオチド

【図 5】



* $P < 0.05$, t-test, mean \pm SEM

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、角膜の術後の角膜知覚回復やドライアイの症状を改善する新しいタイプの医薬を提供することである。

【解決手段】 ソマトスタチン受容体作働薬を適用することにより、白内障手術後、LASIK手術後、神経麻痺性角膜症、角膜潰瘍、糖尿病性角膜症などの角膜神経変性に伴う角膜知覚低下、ドライアイ症状の改善に有用である。

【選択図】 なし

認定・付加情報

| | |
|---------|----------------|
| 特許出願の番号 | 特願 2003-040250 |
| 受付番号 | 50300258670 |
| 書類名 | 特許願 |
| 担当官 | 第五担当上席 0094 |
| 作成日 | 平成15年 2月21日 |

<認定情報・付加情報>

| | |
|-------|-------------|
| 【提出日】 | 平成15年 2月18日 |
|-------|-------------|

次頁無

特願 2003-040250

出願人履歴情報

識別番号

[000199175]

1. 変更年月日

1990年 8月22日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市中央区平野町2丁目5番8号

氏 名

千寿製薬株式会社